

SELEKSI DENGAN BANTUAN MARKA DNA UNTUK PERAKITAN TANAMAN PERTANIAN UNGGUL

Reflinur dan Puji Lestari

Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumber Daya Genetik Pertanian

Jl. Tentara Pelajar 3A, Bogor 16111, Indonesia

PENDAHULUAN

Sejalan dengan perkembangan teknologi pertanian, pemuliaan tanaman telah memberikan kontribusi nyata dalam peningkatan produksi tanaman selama lebih dari satu abad. Teknik pemuliaan pun semakin menarik dan maju, namun untuk sampai pada tahapan pembentukan suatu varietas baru memerlukan waktu yang relatif lama yaitu paling sedikit 10 tahun. Selain itu permulia tanaman juga dihadapkan pada kenyataan: (1) Penciptaan varietas dengan karakter spesifik yang memerlukan perubahan praktik pertanian; (2) Kondisi lingkungan yang senantiasa berubah; dan (3) Perubahan kebutuhan dan pola permintaan konsumen (Brumlop & Finckh 2011). Dengan demikian pemulia tanaman selalu dihadapkan pada tugas yang tak pernah berakhir dalam perakitan varietas unggul.

Populasi penduduk dunia yang makin bertambah menuntut peningkatan produksi pangan, sementara produksi hasil pertanian cenderung menurun. Salah satu faktor yang mempengaruhi

penurunan produksi tersebut adalah karena menurunnya areal pertanian secara umum yang disebabkan oleh alih fungsi lahan seperti untuk industri dan perumahan. Perubahan iklim global juga berdampak utama terhadap cekaman biotik dan abiotik sehingga memacu perakitan varietas baru yang mempunyai daya adaptasi tinggi (Liu & Zhu 2014). Di negara-negara berkembang, seperti Indonesia, yang umumnya masih mengalami permasalahan lingkungan, pemuliaan tanaman sebaiknya lebih dititik beratkan pada perakitan varietas baru yang sesuai di lahan marjinal. Khususnya peran tanaman-tanaman minor yang memiliki karakter ketahanan terhadap lingkungan baik cekaman abiotik maupun biotik yang mampu bertahan dalam jangka waktu yang relatif lama (*durable resistance*) lebih diutamakan (Battisti & Naylor 2009; Ainsworth & Ort 2010).

Kesuksesan yang dicapai pada pemuliaan konvensional perlu dimaksimalkan dengan bantuan bioteknologi. Genetika molekuler atau pemanfaatan teknik marka yang berfungsi untuk mendeteksi diferensiasi individu-individu pada level DNA-nya mempunyai implikasi yang besar dalam usaha perakitan tanaman baru. Teknologi marka DNA yang dikembangkan berdasarkan berbagai motif dan variasi nukleotida di dalam genom, menawarkan harapan baru dengan berbagai kelebihannya dalam usaha memaksimalkan pencapaian pada proses pemuliaan tanaman konvensional (Eathington *et al.* 2007). Berbeda dengan pemuliaan konvensional, pendekatan marka DNA lebih menitikberatkan pada analisis genotip dari pada fenotip. Marka DNA yang dapat digunakan untuk seleksi alel yang diinginkan, secara tidak langsung, dapat terletak dalam gen target atau terkait dengan sebuah gen yang menentukan karakter yang diinginkan (Poczai *et al.* 2013). Penggunaan marka DNA dalam pemuliaan tanaman biasa disebut *marker-assisted selection* (MAS) dan menjadi komponen disiplin keilmuan baru “pemuliaan molekuler” (Wammanda & Jonah 2006; Collard & Mackill 2008).

Meminjam ide “*smart breeding*” (pemuliaan pintar) yang biasa dipakai pada hewan dengan menggabungkan antara MAS dan teknologi reproduksi, pemakaian MAS atau pemuliaan pintar ini mampu menghilangkan beberapa siklus persilangan pada tanaman. MAS juga dapat mengontrol variasi alel dari gen yang terkait dengan karakter yang diinginkan. Intinya, kegiatan seleksi berbasis pendekatan MAS sangat menguntungkan program pemuliaan terutama dapat mempersingkat waktu, lebih efisien dan akurat dibandingkan pemuliaan konvensional. *Pyramiding* kombinasi gen yang sulit dilakukan dengan cara lain, juga dapat dicapai lebih mudah dengan bantuan marka (Xu & Crouch 2008). Namun demikian sebagian ilmuwan kurang optimis terhadap potensi dan pemanfaatan MAS mengingat sebagian besar karakter penting agronomi merupakan sifat kuantitatif. Meskipun QTL (*quantitative trait loci*) untuk berbagai karakter pada berbagai spesies tanaman telah banyak ditemukan, namun penggunaan marka masih dianggap kurang berdampak besar terhadap pengembangan varietas. MAS dengan segala kelebihanannya memang menjanjikan dalam proses seleksi pada program pemuliaan, namun di lain pihak keluaran nyata belum terlalu banyak (Brumlop & Finckh 2011). Kelemahan dalam seleksi populasi dalam jumlah sangat besar memerlukan pendekatan *high throughput* dan keefektifan biaya untuk mendapatkan hasil program pemuliaan yang tepat sasaran.

Kemajuan teknologi telah memfasilitasi ketersediaan sikuen total genom berbagai tanaman pertanian penting seperti tanaman pangan (misal padi, kedelai, jagung, sorgum, ubi kayu, dan gandum), buah-buahan (misal pepaya dan anggur) dan sayuran (misal tomat, mentimun, dan lotus) dengan kemudahan aksesnya untuk publik. Jumlah sikuen total genom dari berbagai spesies tanaman akan semakin bertambah kedepannya terutama dengan adanya proyek 1000 genom tanaman sejak 2008 (Bevan dan Uauy 2013). Informasi database genom total tersebut merupakan modal

potensial dalam membantu penelusuran marka-marka fungsional untuk gen-gen penting. Perkembangan yang pesat dalam teknologi *next generation sequencing* (NGS) mempermudah penemuan marka berbasis variasi nukleotida dalam genom seperti *simple sequence repeat* (SSR) dan *single nucleotide polymorphism* (SNP) (Gupta dan Rustgi 2004; Gupta *et al.* 2008; Appleby *et al.* 2009; Bornet *et al.* 2012). Beberapa perusahaan bioteknologi seperti Illumina, Roche, Life Technologies Solid, Biosciences ikut berperan penting dengan memproduksi berbagai instrumen dengan aplikasi teknologinya terhadap genomik. Hal tersebut semakin memberi harapan untuk dapat mengoptimalkan program perakitan varietas baru melalui pemuliaan genomik untuk mendukung aplikasi MAS. Untuk itu hal ini tidak hanya menjadi tantangan para pemulia, dan ilmuwan seperti agronomi, fisiologi, dan patologi namun juga genetika (Heffner *et al.* 2009; Vogel 2009). Dengan demikian, kajian ilmiah terkait teknologi marka DNA dan prospeknya sangat diperlukan, baik sebagai MAS dalam pemuliaan tanaman, strategi pemuliaan molekuler dan aktivitasnya maupun aplikasi MAS untuk perakitan varietas tanaman baru.

TEKNOLOGI MARKA DNA

Sejak ditemukannya marka untuk sidik jari DNA dengan tujuan forensik, pemanfaatan marka molekuler telah berkembang pesat sampai dengan status terbaru yang serba otomatis dalam analisis genom. Penemuan PCR (*polymerase DNA reaction*) juga telah menjadi tonggak sejarah bukti kemunculan sebuah kelas baru dari marka DNA yang ikut memfasilitasi munculnya berbagai aspek studi, seperti genetika, pemetaan fisik dan genetika maupun berbasis kloning dan marka sebagai agen seleksi dalam pemuliaan dan masih banyak lagi. Marka DNA yang tersedia

makin bervariasi dengan masing-masing kelebihan dan kekurangannya (Farooq & Azam 2002; Collard *et al.* 2005).

Marka molekuler merupakan siku DNA dalam genom dan berasosiasi dengan sifat yang diturunkan atau terkait gen. Penelitian biologi molekuler dan genomik telah menjadikan marka DNA berhasil diaplikasikan dalam pemuliaan. Gen target dalam suatu populasi segregasi dapat diidentifikasi dengan bantuan marka DNA, dengan polimorfisme yang terdeteksi pada level morfologi, biokimia dan molekuler. Deteksi profil DNA yang terbaru juga mewakili kombinasi beberapa lokus sekaligus dan menjadi alat untuk meneliti berbagai aspek genom tanaman. Kriteria marka DNA yang ideal untuk membantu efisiensi kegiatan pemuliaan antara lain adalah: (1) Polimorfismenya tinggi; (2) Frekuensinya tinggi dalam genom; (3) Bersifat kodominan sehingga dapat membedakan *homozygot* dan *heterozygot*; (4) Mempunyai alel yang jelas dibedakan dan tidak terpengaruh lingkungan; (5) *Single copy* dan tidak punya efek *pleiotropic*; (6) Akses dan aplikasinya mudah; 7) Reprodusibilitasnya tinggi dan (8) Bersifat spesifik genom di alam. Namun demikian, marka molekuler yang memiliki semua kelebihan tersebut di atas sangat sulit diidentifikasi karena tergantung dari tipe marka (Xu 2010; Jiang 2013).

Beberapa marka potensial berbasis PCR yang umum diaplikasikan dalam pemuliaan tanaman adalah *randomly amplified polymorphic DNA marker* (RAPD), *amplified fragment length polymorphism* (AFLP), *simple sequence repeat* (SSR), *single nucleotide polymorphism* (SNP) dan sebagian kecil marka lainnya (STS: *sequence tagged site*, SCAR: *sequence characterized amplified region*, ISSR: *inter-simple sequence repeat*) (Semagn *et al.* 2006; Jonah *et al.* 2011). Deskripsi tipe marka DNA ditampilkan pada Tabel 3.1. Kelebihan dan kelemahan masing-masing marka perlu disesuaikan dengan tujuan penelitian, ketersediaan database dan sumber daya genetik, alat dan fasilitas, dana dan sumber daya manusia

Tabel 3.1. Perbandingan sistem marka berbasis PCR*

Deskripsi	RAPD	AFLP	SSR	SNP
Jumlah di genom	Tinggi	Tinggi	Sedang-tinggi	Sangat tinggi
Coverage genom	genome total	genome total	genome total	genome total
Ekspresi/diturunkan	dominan	Dominan/ co-dominan	co-dominan	co-dominan
Jumlah lokus	kecil (<1000)	moderat (1000)	tinggi (1000-10000)	sangat tinggi (>100000)
Level polimorpism	Tinggi	Tinggi	tinggi	tinggi
Tipe polimorpisme	1 bp, indel	1 bp, indel	panjang SSR	1 bp.indel
Tipe primer	nukleotida random 10 bp	sikuen spesifik	sikuen spesifik	primer PCR spesifik alele
Kloning/sikuensing	Tidak	Tidak	ya	ya
Basis PCR	Ya	Ya	ya	ya
Deteksi radioaktif	Tidak	Ya atau tidak	Umumnya tidak	tidak
Reproduksibilitas	rendah	tinggi	tinggi	tinggi
Rasio multiplek	rendah	tinggi	tinggi	tinggi
Indek marka	sedang	sedang-tinggi	tinggi	sedang
Genotyng throughput	rendah	tinggi	tinggi	tinggi
Jumlah DNA	sedikit (0.01-0.1µg)	sedang (0.5-1.0µg)	sedikit (0.05-0.1µg)	sedikit (≥0.05µg)
Kualitas DNA	sedang	tinggi	sedang-tinggi	tinggi
Teknik	rendah	sedang	rendah	tinggi
Waktu analisis	rendah	Sedang	rendah	rendah
Kemudahan aplikasi	mudah	sedang	mudah	mudah
Otomatisasi	sedang	sedang-tinggi	tinggi	tinggi
Biaya pembuatan	rendah	sedang	sedang-tinggi	tinggi
Biaya per analisis	rendah	sedang	rendah	rendah
Jumlah lokus	1.5-5.0	20-100	1.0-3.0	1.0
polymorpik/analisis				
Aplikasi utama	diversitas	diversitas dan genetik	berbagai tujuan	berbagai tujuan

*Disitir dari Jiang 2013

dan lainnya. Oleh sebab itu, pemilihan marka molekuler dalam penelitian dan pemuliaan masih menjadi tantangan para pemulia tanaman. Pemulia harus menentukan pilihan yang tepat sesuai keperluan berdasarkan kondisi dan sumber daya yang ada untuk program pemuliaan.

Prospek Marker-Assisted Selection (MAS) dalam Pemuliaan Tanaman

Performa varietas merupakan hasil akhir dari aksi ribuan gen dan interaksinya dengan lingkungan dan praktik kultural. Seleksi varietas dengan karakter yang diinginkan sesuai kondisi lingkungan dan kultur budaya merupakan dasar fundamental pemuliaan tanaman. Pengembangan marka molekuler jaman sekarang memungkinkan langsung pada sasaran daerah genom target yang terlibat dengan ekspresi karakter yang diinginkan. Dengan demikian MAS lebih menguntungkan daripada seleksi fenotipe secara konvensional, dan tergantung pada spesies tanaman dan karakter yang diinginkan (Jonah *et al.* 2011). Secara umum MAS lebih efisien, efektif, singkat dari pemuliaan konvensional, dan dalam beberapa kasus lebih murah.

Terobosan utama pemanfaatan marka adalah seleksi genotip yang memungkinkan tidak hanya pada sifat kualitatif (gen tunggal) tetapi juga karakter kompleks yang melibatkan banyak gen. Sebagian besar karakter agronomi penting yang bersifat kuantitatif bersifat kompleks dan diatur oleh banyak gen, seperti hasil panen, ketahanan terhadap cekaman abiotik, kualitas, dan ketahanan terhadap penyakit. Daerah dalam genom yang mengandung gen yang berasosiasi dengan sifat kuantitatif atau disebut QTL, mendorong aplikasi marka molekuler untuk seleksi QTL (Vogel 2009).

Mengingat gen yang diinginkan biasanya secara alami sudah ada dalam tanaman sehingga dalam seleksi tidak ada gen asing yang diintroduksi, MAS menjadikan pemuliaan untuk karakter kompleks lebih menjanjikan dibandingkan dengan pemuliaan konvensional. Selain itu, penelitian genomik juga berhasil memberikan informasi berharga tentang fungsi dan struktur gen, yang sangat membantu proses penciptaan varietas baru melalui pemuliaan molekuler (Bevan & Yaury 2013). Meskipun kegiatan

rekayasa genetik lebih mendapat perhatian publik, namun MAS terus bergerak maju walau kurang gaungnya. MAS mendorong pembuatan varietas baru lebih realistis dan dapat menjadi metode alternatif selain pendekatan rekayasa genetika.

Optimisme MAS membuktikan potensinya untuk meningkatkan level pemuliaan lebih baik di masa depan. Perkembangan teknologi pembuatan marka, pemetaan, seleksi genomik dan pemuliaan dibantu meatabolomik ikut berkontribusi terhadap optimisme ini. Berbagai modifikasi marka untuk meningkatkan manfaat dan otomatisasi melalui analisis genom untuk tujuan seleksi juga berjalan seiring. Pendekatan genomik juga menjadi penting karena mampu lebih menitikberatkan pada pembuatan marka fungsional yang dapat membantu identifikasi gen yang terkait dengan karakter target yang penting dalam program pembuatan varietas baru. Para pemulia segera dapat mendisain genotipe dan mengaplikasikan seleksi berbasis total genom. Artinya, pemuliaan dengan bantuan marka (*marker-assisted breeding*) berangsur berubah menjadi pemuliaan dengan bantuan genomik (*genomics-assisted breeding*) (Varsney *et al.* 2005). MAS diarahkan menjadi lebih murah dan mudah pada skala populasi besar berdasarkan pendekatan genomik dan menjadi program rutin pemuliaan pada dekade selanjutnya. Jangka pendek, MAS menggantikan metode fenotipe pada karakter kualitatif dan jangka menengah, dititikberatkan dari karakter kualitatif ke kuantitatif (Xu & Crouch 2008). Dengan demikian kesuksesan teknologi marka DNA untuk perbaikan genetik tanaman memerlukan interaksi sinergis antara pemulia dan ahli bioteknologi, dan interaksi antara ketersediaan tenaga kerja yang ahli dan dana finansial yang diinvestasikan untuk penelitian.

Strategi pemuliaan molekuler

Strategi pemuliaan tanaman dengan bantuan marka selama ini sering dilakukan dalam perakitan varietas baru dapat diringkas sebagai berikut:

Seleksi galur atau populasi

Langkah pertama dalam kegiatan pemuliaan tanaman adalah memilih galur sebagai tetua untuk pembentukan populasi. Secara konvensional, seleksi tetua didasarkan pada kombinasi antara karakter fenotipe, informasi *pedigree* dan data persilangan. Namun saat sekarang, marka molekuler dapat dijadikan sebagai alat bantu dalam evaluasi plasma nutfah, sehingga seleksi menjadi lebih efisien, dan dapat memperluas *gene pool* kultivar modern (Xu & Crouch 2008). Kemudahan pada proses persilangan, seleksi awal generasi berdasar fenotipe secara konvensional dapat dipercepat dengan bantuan marka molekuler. MAS juga relatif efisien diaplikasikan pada populasi berskala besar untuk karakter yang memiliki heritabilitas yang rendah, namun keterbatasan dana, penentuan marka molekuler yang cocok dan sumber daya manusia merupakan faktor yang perlu dipertimbangkan.

Introgresi silang balik dengan bantuan marka (MABC)

Silang balik dalam pemuliaan tanaman ditujukan untuk mentransfer (*introgresi*) karakter yang diinginkan dari tetua donor ke dalam suatu kultivar elit (*recurrent*). Dalam silang balik, gen donor diharapkan tereliminasi pada *recurrent*, namun kenyataannya segmen donor masih relatif banyak terpaut dengan alel target sampai beberapa generasi. Evaluasi individu tanaman dalam suatu populasi bersegregasi menggunakan marka molekuler

dapat meminimalkan fenomena pautan tersebut, karena melalui pendekatan ini gen atau QTL target (seleksi *foreground*) dapat dipantau dan pengembalian genom *background* pada *recipient* (seleksi *background*) dapat dipercepat (Ribaut *et al.* 2010). Melalui pendekatan MAS rekonstruksi genotip tetua *recurrent* dapat dilakukan hanya sampai BC₃, sementara melalui pendekatan secara konvensional membutuhkan waktu sampai BC₇.

Marka molekuler lebih efektif untuk mengkonfirmasi intogresi gen atau QTL yang berasal dari *landrace* dan karabat liar karena dapat mempersingkat waktu dalam menghasilkan kultivar baru dan memutus hubungan dari karakter yang tidak diinginkan pada *landrace* atau spesies liarnya (Dwivedi *et al.* 2007). Namun demikian, silang balik dengan bantuan marka (MABC) akan efektif bila alel tunggal yang ditransfer. Sedangkan, untuk genotip dengan kompleksitas tinggi tidak cukup hanya melalui pendekatan silang balik berbasis marka molekuler (MABC) saja, tetapi juga membutuhkan seleksi *recurrent* dengan bantuan marka molekuler (MARS) (Hospital 2003).

Seleksi recurrent dengan bantuan marka (MARS)

Secara umum, peningkatan karakter kompleks melalui seleksi *recurrent* berdasarkan fenotipe memungkinkan untuk dilakukan, akan tetapi memerlukan siklus seleksi yang panjang. Dengan bantuan marka molekuler, seleksi *recurrent* dapat dipercepat, dan mungkin hanya perlu satu tahun seleksi dengan MARS pada genotipe sebelum pembungaan. Genotip ideal dengan semua QTL yang membawa alel yang menguntungkan dari semua tetua juga memungkinkan untuk diperoleh dalam beberapa generasi persilangan (Johnson 2004; Jiang *et al.* 2007).

Pyramiding dengan Bantuan Marka

Pyramiding adalah proses penggabungan beberapa gen atau QTL secara bersamaan ke dalam suatu varietas tanaman. Proses ini sangat sulit dilakukan dan kadang tidak mungkin apabila dilakukan melalui seleksi fenotipe, terutama untuk karakter ketahanan tanaman terhadap suatu penyakit dalam jangka panjang. Efek akumulasi dari *pyramiding QTL multiple* telah banyak diaplikasikan pada tanaman seperti gandum, *barley* dan kedelai (Li *et al.* 2010; Wang *et al.* 2012). Varietas yang memiliki satu gen ketahanan mayor dalam merespons suatu penyakit sangat sulit diintrogressikan dengan gen ketahanan tambahan karena mempunyai fenotipe sama. Namun, apabila suatu gen ketahanan telah ditandai dengan marka molekuler, sejumlah gen ketahanan dapat ditentukan pada tanaman apapun (Collard & Mackill 2008).

Strategi *pyramiding* umumnya menggabungkan beberapa gen seperti ketahanan terhadap penyakit dan serangga, ketahanan secara kualitatif dan kuantitatif yang dikontrol oleh QTL. Dalam hal ini, MAS dapat diaplikasikan ketika pemulia merakit *pyramiding* gen ketahanan penyakit atau serangga dengan kemiripan fenotipe, terutama bila ada gen yang bersifat menutupi efek gen lainnya (Richardson *et al.* 2006), seperti, *yellow mosaic virus barley* (BaYMV) yang disebabkan oleh berbagai strain BaYMV dan BaMMV (*mild mosaic virus barley*) dan blas pada tanaman padi (Luo *et al.* 2012). Meskipun MAS menjanjikan dalam memonitor *pyramiding*, namun demikian pada praktek pemuliaan, *pyramiding* harus diulang pada tiap persilangan karena gen ketahanan yang dipiramidakan ikut bersegregasi pada progeninya (Werner *et al.* 2005).

Aktivitas pemuliaan dengan bantuan markadna

Pemuliaan molekuler dengan bantuan marka diharapkan dapat saling melengkapi dengan teknik rekayasa genetika dalam perakitan varietas baru. Dalam beberapa hal bahkan MAS menawarkan beberapa kemudahan yang dapat menjadi pertimbangan sebelum diaplikasikan. Mengingat gen yang diintrogresikan dengan MAS adalah *gene pool* alami maka aplikasinya dapat diterapkan pada semua *species* tanaman (Ribaut *et al.* 2010). Aktivitas persilangan berbasis MAS terutama yang melibatkan introgresi dan silang balik merupakan pendekatan yang sangat menjanjikan karena varietas yang diperoleh secara genetik tergolong aman, dapat diterapkan pada pertanian organik dan mungkin lebih mudah diterima oleh publik.

Secara sederhana aktivitas pemuliaan dengan MAS dapat digambarkan sebagai berikut (Jiang 2013): (1) Penanaman populasi dengan segregasi potensial untuk karakter yang diinginkan; (2) Pengambilan sampel jaringan misalnya daun saat pertumbuhan awal tanaman; (3) Isolasi DNA genom; (4) Analisis PCR atau amplifikasi dengan teknik lain dengan marka yang berasosiasi dengan karakter target; (5) Visualisasi dan skoring ampikon dengan teknik sesuai sumber daya; (6) Identifikasi galur yang membawa alel target; (7) Seleksi galur terbaik dengan alel marka dan fenotipe yang diinginkan berdasarkan gabungan hasil molekuler dengan marka dan kriteria lain; dan (8) Pengulangan aktivitas di atas dilakukan sampai beberapa generasi tergantung hasil asosiasi marka dan karakter yang diinginkan dan status alel marka (*homozygote* atau *heterozygot*) sampai diperoleh galur harapan yang stabil.

Prosedur pemuliaan molekuler secara ringkas dapat digambarkan sebagai berikut: (a) Pemilihan tetua dan pembentukan persilangan dengan salah satu tetua atau keduanya membawa alel untuk karakter yang diinginkan; (b) Identifikasi alel pada

populasi F₁; (c) Skrining individu F₂ dengan marka panen galur yang membawa alel marka yang diinginkan; (d) Skrining individu tanaman dari bulk F_{2:3} dengan marka yang mungkin diperlukan untuk penelusuran tanaman F₂ *homozygot*, dan panen individu dengan alel dan karakter yang diinginkan; (e) Skrining generasi lanjut seperti F₄ dan F₅ dengan marka dan seleksi individu/kelompok superior yang *homozygot*; (f) Pada generasi F_{5:6} atau F_{4:5}, dilakukan BSA untuk galur terbaik berdasarkan fenotipe; dan (g) Uji secara komprehensif terhadap komponen hasil dan karakter terkait lainnya.

Seleksi dengan bantuan marka molekuler seperti tergambar di atas, secara teori dapat melibatkan berbagai QTL yang berkontribusi dengan karakter yang diinginkan, namun dalam praktik tetap cukup kompleks. MAS kurang efektif untuk karakter kompleks yang dikontrol banyak gen dibandingkan dengan karakter yang dikontrol oleh lebih sedikit gen. Jumlah gen/QTL berdampak tidak hanya pada efisiensi MAS tetapi juga disain pemuliaan dan implementasinya. Secara khusus, tidak lebih dari 3 QTL yang dapat dilibatkan dalam MAS untuk pengembangan varietas baru, meskipun pada tanaman tomat dilaporkan terdapat sebanyak 5 QTL yang terlibat (Lecomte *et al.* 2004). Selain itu, ada kecenderungan bahwa semakin banyak marka yang terkait QTL maka semakin tinggi kemungkinan kesuksesan seleksi QTL untuk karakter yang diinginkan, meskipun tetap mengutamakan efektivitas dan efisiensi tergantung dari marka fungsional sebagai alat seleksi (Flint-Garcia *et al.* 2003). Dengan perkembangan *high throughput* marka dan *genotyping*, seleksi beberapa QTL dalam satu waktu sudah memungkinkan (Henry 2008; Kumpatla *et al.* 2012). Walaupun demikian evaluasi fenotipe tetap masih diperlukan, terutama apabila QTL yang terseleksi tidak stabil dalam berbagai lingkungan dan asosiasinya dengan marka tidak terlalu dekat (Jiang 2013). Dalam praktik, pemulia juga harus mempertimbangkan tingkat akurasi marka dalam deteksi, seberapa banyak

generasi untuk MAS dan seberapa besar populasi yang digunakan.

Aplikasi MAS untuk Perakitan Varietas Baru

Marka molekuler dapat diaplikasikan pada skala luas dari penempatan lokasi gen sampai pengembangan varietas tanaman dengan MAS. Analisis genom juga telah menghasilkan banyak informasi berharga dan database yang bermanfaat untuk pemuliaan (Joshi *et al.* 2011). Dibandingkan dengan negara lain, aplikasi MAS menggunakan marka molekuler hasil pemetaan genetik peneliti Indonesia belum banyak dilaporkan. Menurut Reflinur & Lestari (2015), para peneliti Indonesia lebih banyak memanfaatkan marka DNA yang berasosiasi dengan gen pengendali karakter yang telah dilaporkan oleh peneliti di luar negeri untuk diaplikasikan dalam menyeleksi materi pemuliaan yang dikembangkan di Indonesia. Reflinur & Lestari (2015) menyatakan bahwa beberapa penelitian terkait pemetaan genetik untuk mendapatkan marka molekuler yang berasosiasi dengan karakter kualitatif maupun kuantitatif telah dilakukan di Indonesia, akan tetapi, untuk tanaman selain padi, marka molekuler tersebut masih belum banyak diaplikasikan untuk mendukung program pemuliaan tanaman di Indonesia. Hal ini kemungkinan disebabkan karena marka yang telah dipetakan tersebut belum tervalidasi dengan baik.

Beberapa contoh aplikasi MAS dapat dilihat pada beberapa komoditas tanaman di bawah ini.

Padi

Sikuen genom padi beserta beberapa databasenya yang berisi informasi genetik termasuk ribuan gen dan QTL untuk berbagai karakter sudah tersedia dalam jumlah yang cukup lengkap dan

dapat diakses oleh publik. Semua data genomik tersebut penting dimanfaatkan untuk MAS dalam program pemuliaan, terutama dalam menghadapi tantangan yang dihadapi dalam pengembangan varietas baru. Oleh sebab itu, varietas baru yang dikembangkan dari hasil MAS lebih banyak pada tanaman padi dibandingkan dengan komoditas serealia lainnya. Aplikasi MAS yang telah sukses pada tanaman padi di antaranya adalah untuk mengontrol ketahanan padi terhadap penyakit *bacterial leaf blight* (BLB), kualitas dan toleransi terhadap stress abiotik.

Pemuliaan pada padi yang menyerbuk sendiri tersebut, umumnya adalah untuk *pyramiding* gen ketahanan terhadap penyakit, terutama *bacterial blight* dan blas. Tahun 2002 kultivar tahan BLB hasil seleksi dengan MAS yaitu "Angke" yang membawa gen *xa5* dan "Conde" membawa *xa7* berhasil dilepas di Indonesia (Bustamam *et al.* 2002) dan "Tubigan4" di Filipina. Di Cina, "Xieyou218" adalah padi hribrida pertama tahan BLB hasil MAS yang dilepas secara komersial (Cheng *et al.* 2007). Varietas padi hasil MAS pertama tahan BLB dalam plasma nutfah aromatik dikenal "Pusa1460" dan hasil *pyramiding triple* BLB, yaitu "RP BIO 226" (Vogel 2009).

Peningkatan kualitas padi yang terkait rasa, performa dan proses penanakan nasi sebenarnya pada awalnya ditujukan terhadap potensial hasil, dimana banyak varietas padi dengan gabah tinggi tetapi kualitas bijinya rendah (Zhang 2007). Varietas padi hasil MAS dengan kualitas tanak yang unik dan prosesing berhasil dilepas ke pasaran, kultivar "Cadet" dan "Jacinto". Menariknya lagi, hanya perlu waktu 5 tahun dalam penciptaan kultivar tersebut (Vogel 2009).

Tahun 2006, dua galur tahan genangan hasil introgresi lokus katahanan genangan berhasil dikembangkan yaitu "FR13A" dan "Swarma" (Xu *et al.* 2006). Tahun 2007, "MAS946-1" merupakan varietas aerobik pertama tahan kekeringan yang dilepas di India sebagai hasil seleksi MAS selama 5 tahun. Varietas ini meng-

konsumsi air 60% lebih sedikit daripada varietas tradisional. Di Bangladesh varietas “BR11” dan “BR28” tahan salinitas merupakan hasil silang balik dengan bantuan marka (MABC) yang dilepas sekitar tahun 2010 (Vogel 2009).

Meskipun di Indonesia kegiatan pemuliaan molekuler berbasis MAS pada tanaman padi tidak seintensif yang dilakukan oleh peneliti di negara lain, para peneliti Badan Litbang Pertanian Indonesia terus berusaha memanfaatkan pendekatan MAS dalam program pemuliaan padi. Utami *et al.* (2010) memanfaatkan pendekatan MAS untuk mengeksplorasi keberadaan alel Xa7 pada plasma nutfah padi Indonesia dan sekaligus mengembangkan marka molekuler SNP dengan presisitinggi sebagai kandidat marka molekuler yang akan digunakan sebagai alat seleksi kedepannya. Sebanyak dua kandidat variasi alel gen Xa7 telah berhasil diidentifikasi oleh Utami *et al.* (2010), yaitu variasi alel yang berkaitan dengan protein kinase domain dan protein 3-hydroxyisobutirate dehidrogenase masing-masing ditemukan pada plasma nutfah padi Parekaligolar (Indica, 15141) dan Gajah Mada (Indica, 5856). Kedua variasi alel untuk gen Xa7 telah berhasil mereka petakan pada posisi LD map 28,05-28,1 Mb dari kromosom 6, yang ditandai dengan marka yang terpaut Xa7-SNP8 dan Xa7-SNP11. Kedua marka tersebut dapat digunakan untuk membantu proses seleksi plasma nutfah ataupun hasil pemuliaan untuk karakter ketahanan hawar daun padi sebagai marka MAS kedepannya. Pemanfaatan marka molekuler juga telah diaplikasikan untuk mengidentifikasi dan menseleksi plasma nutfah padi yang memiliki palatabilitas tinggi di Indonesia. Lestari *et al.* (2012) telah berhasil mengembangkan marka STS berbasis genom padi Japonica untuk mengidentifikasi padi indica Indonesia yang mempunyai palatabilitas tinggi dengan identitas unik. Dilaporkan bahwa varietas Rojolele teridentifikasi sebagai varietas padi Indonesia dengan palatabilitas tinggi. Profil sidik jari DNA varietas padi Indica dan Japonica termasuk beras

premium (Rojolele, Indica dan Ilpum, japonica) berhasil dibuat dengan menggunakan set marka STS yang terpaut palatabilitas dalam nilai digital. Analisis homologi menunjukkan bahwa fragmen hasil amplifikasi primer STS yang merupakan hasil modifikasi dari RAPD tidak terpaut dengan gen-gen pada padi yang mengontrol mutu rasa beras, dan terletak secara acak di genom padi (Lestari *et al.*, 2012). Aplikasi MAS di Indonesia juga ditujukan untuk perbaikan varietas padi yang memiliki potensil hasil tinggi, tahan terhadap hawar daun bakteri, dan berumur genjah. Tasliah *et al.* (2016) memanfaatkan marka molekuler terkait gen pengendali karakter potensil hasil tinggi (RM17483 dan RM6838 untuk lokus qTSN4), ketahanan terhadap hawar daun bakteri (RM20582 untuk posisi QTL gen Xa7), dan umur genjah (RM6909 dan RM5556 untuk lokus qDTH8) sebagai alat seleksi galur-galur padi hasil persilangan. Pada penelitian tersebut, Code yang merupakan varietas padi Indonesia yang memiliki gen ketahanan terhadap penyakit hawar daun bakteri (Xa7) digunakan sebagai tetua *recurrent* dalam persilangan dengan tetua donor yang membawa karakter target. Sebanyak dua jenis kombinasi persilangan telah mereka rakit, yaitu antara varietas Code dan IR64-NILs-qTSN4(YP9) sebagai donor karakter hasil tinggi pada padi dan antara Code dan IR64-NILs-qDTH8 (YP1) yang membawa lokus pengatur umur berbunga genjah. Keberadaan segmen yang berasal dari tetua donor maupun keberadaan karakter unggul (ketahanan terhadap hawar daun) pada progeni hasil persilangan dimonitor secara dini menggunakan marka molekuler untuk masing-masing karakter. Dalam kegiatan seleksi terhadap masing-masing karakter, mereka berhasil menseleksi individu-individu tanaman yang membawa alel qTSN4 dan qDTH8 ditunjukkan oleh pola pita heterozigot (HHA) untuk masing-masing karakter. Mereka menemukan bahwa introgresi lokus qTSN4 dan qDTH8 pada galur-galur terseleksi terbukti dapat memperpendek umur dan meningkatkan jumlah bulir isi dan bobot bulir

isivarietas Code. Umur berbunga galur qTSN4 dan qDTH8 terseleksi diketahui lebih genjah, yaitu 12–13 hari lebih genjah dibandingkan dengan tetua Code, sedangkan jumlah bulir isi per malai galur qTSN4 129,52 lebih banyak dibandingkan dengan Code (114,75). Bobot bulir isi per tanaman qTSN4 dan qDTH8 masing-masing 34,5 g dan 24,7 g, sedangkan Code hanya 15,23 g (Tasliyah *et al.* 2016). Berdasarkan informasi tentang aplikasi MAS pada pemuliaan tanaman padi tersebut, diharapkan agar program pemuliaan berbasis molekuler pada tanaman padi di Indonesia perlu mendapat perhatian khusus dalam rangka memperpendek siklus pemuliaan yang selama ini belum terpecahkan secara konvensional.

Serealia (Jagung, Barley, dan Gandum)

Tanaman gandum dan *barley* umumnya merupakan tanaman yang menyerbuk sendiri (*self pollination*), sedangkan jagung menyerbuk silang (*cross pollination*). Varietas jagung mayoritas dikembangkan dari hasil pemuliaan hibrida F₁. Pemakaian marka seperti RFLP (*restriction fragment length polymorphism*) dan SSR banyak digunakan di komoditas jagung. Aplikasi MAS yang penting di jagung adalah silang balik transgen ke dalam *elite inbred line*. Contoh keberhasilannya, adalah konversi galur jagung normal ke “QPM” (*Quality Protein Maize*) yang mengandung lysine dan tryptophan lebih tinggi daripada jagung normal (Babu *et al.* 2003). Program MAS untuk mengkonversi plasma nutfah lokal menjadi QPM sebenarnya juga telah diinisiasi di Cina, Vietnam dan Indonesia. Hanya perlu waktu 3 tahun, para peneliti India menciptakan “Vivek QPM 9” dan mereka berhasil mengomersialisasikannya (Gupta 2009) dan ternyata cocok untuk pertanian organik. Berbeda dengan tanaman padi, aplikasi MAS atau marka molekuler sebagai alat seleksi pada tanaman jagung di Indonesia tergolong masih sangat terbatas, belum ada institusi

dalam lingkup Badan Litbang Pertanian yang menggunakan strategi pemuliaan molekuler dalam perbaikan varietas maupun pembentukan varietas unggul baru pada tanaman jagung. Meskipun demikian, Surahman *et al.* (2012) telah berhasil mengidentifikasi marka-marka molekuler yang spesifik untuk tetua-tetua hibrida jagung. Lima marka mikrosatelit atau SSR yang spesifik terhadap tetua jagung hibrida telah ditemukan, yaitu phi 109275 teridentifikasi spesifik untuk tetua hibrida Bima-4, marka phi072 spesifik untuk tetua Bima-3 (MR-14 dan Nei9008), dan marka phi328175 teridentifikasi spesifik untuk tetua hibrida Bima-3 dan Bima-4. Berdasarkan hasil penelitian tersebut, penelitian lebih lanjut sangat diperlukan untuk mengidentifikasi lebih detil lagi tentang keterkaitan marka-marka tersebut dengan gen pengendali karakter heterosis pada tanaman jagung sehingga marka baru yang benar-benar tervalidasi terkait dengan karakter heteoris dapat dikembangkan sebagai alat seleksi (MAS) dalam program pemuliaan jagung.

Aplikasi MAS pada tanaman *barley* lebih maju daripada di gandum, mungkin disebabkan oleh lebih sederhananya ukuran genom yang dimiliki *barley*. Pada pemuliaan *barley*, MAS banyak dititikberatkan pada ketahanan terhadap berbagai jenis penyakit, seperti *yellow mosaic virus* dan karat. Varietas “Tango” yang membawa dua QTL ketahanan karat dilepas tahun 2000 (Hayes *et al.* 2003), dan diklaim sebagai varietas komersial pertama yang dibentuk dengan bantuan MAS. Di Australia, “SloopSA” juga berhasil dilepas, yang merupakan hasil antara Sloop tahan *cyst nematode* yang diintrogresikan ke Chebec (Eglinton *et al.* 2006).

Katahanan terhadap stress abiotik merupakan prioritas utama pada pemuliaan gandum. Permasalahan kompleksitas pada karakter cekaman kekeringan menjadikan MAS sebagai alternatif dalam solusinya. Penggunaan marka DNA untuk melacak gen-gen terkait kekeringan telah berhasil dilakukan pada varietas Drysdale yang merupakan varietas gandum tahan kekeringan

hasil pemuliaan konvensional. Varietas baru hasil MAS tersebut telah dikomersialkan pada tahun 2010 (Finkel 2009). Upaya peningkatan nutrisi, seperti *zinc* pada gandum juga dilakukan dengan MAS. Ada beberapa varietas gandum tahan penyakit hasil MAS yang dilepas di USA antara tahun 2006-2007 (“Patwin, Espresso, Lassik, Farnum, Westmore, dan ADS2026”).

Kedelai

Mengingat potensi kedelai sebagai sumber minyak dan protein nabati utama, MAS dipandang perlu dalam pemuliaan kedelai. Strategi aplikasi MAS yang tepat, yang umumnya menggunakan SSR, sangat diperlukan karena kecenderungan variasi genetik kedelai yang rendah sehingga diperlukan perluasan plasma nutfah. Sampai sekarang MAS pada kedelai umumnya dititikberatkan ke arah ketahanan terhadap penyakit, sedangkan jangka panjangnya adalah peningkatan jumlah bintil akar dan ketahanan terhadap pecah polong (Jonah *et al.* 2011). Contoh keberhasilan aplikasi MAS menggunakan marka SSR pada kedelai adalah dengan dilepasnya dan registrasi kultivar “Sheyenne” yang dikembangkan dari Pioneer pada tahun 2008 (Helms *et al.* 2008) serta kultivar “JTN-5303” dengan ketahanan terhadap penyakit berhasil dilepas tahun 2005 (Vogel 2009).

Kentang dan Ubi Jalar

Kentang merupakan tanaman tetraploid dan juga tetrasomik yang diturunkan, sehingga sampai sekarang aplikasi MAS masih sangat terbatas. Pengembangan teknologi yang merubah tetraploid menjadi diploid dan marka DNA khusus memungkinkan untuk mengkonstruksi peta genetik dan studi GWAS (*genome wide association study*) pada ketahanan penyakit baik kualitatif maupun kuantitatif. Namun demikian kebanyakan marka yang

daplikasikan terutama untuk populasi kentang diploid yang dapat diterapkan pada pemuliaan. MAS telah diterapkan untuk mengembangkan varietas dengan ketahanan terhadap tiga patogen berbeda dan nemotoda cys akar (*Globodera rostochiensis*) (Brumlop & Finckh 2011).

Ubi jalar merupakan makanan pokok mayoritas penduduk Afrika, dan dibuat sebagai kandidat tanaman untuk biofortifikasi, sumber vitamin A. Melalui pemuliaan konvensional telah dilepas ubi jalar dengan kandungan provitamin A yang tinggi di negara-negara Afrika. Dengan ditemukannya marka DNA pada tanaman jagung untuk provitamin A, diharapkan dapat diaplikasikan pada tanaman ubi jalar sehingga varietas baru yang berbiofortifikasi dengan bantuan MAS dapat dilakukan (Vogel 2009).

Ubi kayu merupakan salah satu komoditas yang melimpah dan mudah dibudi dayakan di beberapa negara di Afrika dan Asia termasuk Indonesia. Pada awal pengembangan marka, ubi kayu menjadi salah satu komoditas yang diperhitungkan. Pengembangan marka untuk karakter paska panen dan ketahanan terhadap virus menjadi penekanan bagi pemulia. Sedangkan berdasarkan kebutuhan, prioritas utama seharusnya pada marka-marka untuk ketahanan terhadap stress abiotik dan penyimpanan. ICTA (International Centre for Tropical Agriculture) telah menjalankan proyek untuk mengembangkn ubi kayu dengan provitamin A yang tinggi melalui MAS (Vogel 2009).

Kacang-kacangan, sayuran dan buah-buahan

Beberapa marka telah diterapkan pada program pemuliaan selada, cabe, mentimun, tomat dan beberapa kacang-kacangan kelompok *Phaseolus*. Marka DNA seperti RAPD dan SCAR lebih umum digunakan untuk seleksi, termasuk untuk peningkatan

hasil produksi dan ketahanan terhadap penyakit (Fan *et al.* 2006; Brumlop & Finckh 2011).

Berbagai marka DNA telah diaplikasikan pada plasma nutfah kacang-kacangan ini. AFLP untuk evaluasi variasi genetik kacang tanah, marka di *cowpea* dikhususkan pada asosiasinya dengan ketahanan terhadap penyakit seperti *thrips*, *bruchids pod borer*, parasit dan kekeringan. Identifikasi marka yang paling cocok untuk penentuan *pathotype* penyebab penyakit di *chickpea* telah diprioritaskan juga. Hal ini bertujuan untuk memonitor distribusi *pathotype* sehingga dapat membuat rekomendasi jenis kultivar untuk budi daya (Jonah *et al.* 2011). Beberapa galur kacang-kacangan (termasuk *P. vulgaris* L) dan varietas tahan *golden mosaic virus* dan membawa QTL untuk *bacterial blight* telah didaftarkan untuk pelepasan (Baever *et al.* 2008).

Pemakaian MAS dalam hubungannya dengan biaya, lebih efisien pada tanaman buah daripada tanaman tahunan karena umumnya program pemuliaan tanaman buah dilakukan melalui dua tahap. Tahap awal, evaluasi dan seleksi individu untuk propagasi asexual secara ekstensif untuk direplikasi di tahap selanjutnya. Dengan MAS, jumlah tanaman yang akan diuji di awal tahap dapat turun drastis. Namun banyak karakter agronominya terakit dengan gen mayor (ketahanan *multiple* penyakit, karakter bunga, buah) dan sangat sedikit QTL yang teridentifikasi. Namun sejak 2009, teknologi marka bersama dengan genomik dapat memacu keberhasilan pemuliaan buah-buahan (Brumlop & Finckh 2011).

KESIMPULAN

Perkembangan teknologi marka DNA berbasis PCR dan analisis genomik dengan teknologi canggih sangat membantu pemuliaan tanaman lebih baik di masa depan. MAS mendorong pembuatan varietas baru lebih realistis dan dapat menjadi alter-

natif dari rekayasa genetika. Strategi pemuliaan tanaman dengan bantuan marka dilakukan berdasarkan karakter/gen yang diinginkan dan spesies tanaman, dapat melalui seleksi galur atau populasi, silang balik dengan bantuan marka (MABC), seleksi *recurrent* dengan bantuan marka (MARS) dan *pyramiding* dengan bantuan marka. Aktivitas MAS dapat diterapkan pada semua spesies tanaman, namun memerlukan beberapa pertimbangan mengenai tingkat akurasi marka dalam deteksi, berapa banyak generasi untuk MAS dan berapa besar populasi yang digunakan. Marka molekuler telah diaplikasikan sebagai MAS secara luas untuk pengembangan varietas unggul pada berbagai tanaman pertanian seperti serealia (padi, jagung, gandum, *barley*), kacang-kacangan (kedelai dan lainnya), umb-umbian (kentang, ubi jalar, singkong), sayuran dan buah-buahan.

DAFTAR PUSTAKA

- Ainsworth EA, Ort DR. 2010. How do we improve crop production in a warming world. *Plant Physiol.* 154:526-530.
- Appleby N, Edwards D, Batley J. 2009. New technologies for ultra-high throughput genotyping in plants. In: Gustafson JP, Langridge P, Somers DJ, Totowa NJ, editors. *Methods in molecular biology, plant genomics.* vol. 513. Humana Press.
- Babu ER, Mani VP, Gupa HS. 2004. Combining high protein quality and hard endosperm traits through phenotypic and marker assisted selection in maize. *Proceedings of the 4th International Crop Science Congress, Brisbane.*
- Battisti DS, Naylor RL. 2009. Historical warnings of future food insecurity with unprecedented seasonal heat. *Science.* 32:240-244.

- Beaver JS, Porch TG, Zapata M. 2008. Registration of 'Verano' white bean. *J Plant Regist.* 2:187-189.
- Bevan MW, Uauy C. 2013. Genomics reveals new landscape for crop improvement. *Genome Biol.* 14:206.
- Bornet B, Branchard M. 2012. Non-anchored Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) markers: Reproducible and specific tools for genome fingerprinting. *Plant Mol Biol Rep.* 19:209-215.
- Brumlop S, Finckh MR. 2011. Applications and potentials of markers assisted selection (MAS) in plant breeding. Bundesamt für Naturschutz (BfN)-Federal Agency for Nature Conservation publ., Germany.
- Bustamam M, Tabien RE, Suwarno A, Abalos MC, Kadir TS, Ona I, Bernardo M, Vera Cruz CM, Leung H. 2002. Asian rice bioethnology network: improving popular cultivars through marker-assisted backcrossing by the NARES. In Abstract of Int Rice Cong. Beijing. 16-22 September 2002. Int Rice Research Inst. Manila, Philippines, and Chinese Academy of Agricultural Sci. Beijing.
- Cheng SH, Zhuang JY, Fan YY, Du JH, LY Cao. 2007. Progress in research and development on hybrid rice: a super-domesticated in China. *Annals of Botany* 100: 959-966.
- Collard BCY, Jahufer MZZ, Brouwer JB, Pang ECK. 2005. An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: the basic concepts. *Euphytica.* 142:169-196.
- Collard BCY, Mackill DJ. 2008. Marker-assisted selection: an approach for precision plant breeding in the twenty-first century. *Philosophical Transactions of the Royal Society* 363: 557-572.

- Dwivedi SL, Crouch JH, Mackill DJ, Xu Y, Blair MW, Ragot M, Upadhyaya HD, R. Ortiz. 2007. The molecularization of public sector crop breeding: Progress, problems, and prospects. *Adv Agronomy*. 95:163-318.
- Eathington SR, Crosbie TM, Edwards MD, Reiter RS, Bull JK. 2007. Molecular markers in a commercial breeding program. *Crop Sci*. 47:S154-S163.
- Eglinton J, Coventry S, Chalmers K. 2006. Breeding outcomes from molecular genetics. In: Mercer CF, editor. *Breeding for success: Diversity in action*, Proceedings of the 13th Australas Plant Breed Conference, Christchurch, New Zealand, pp. 743-749.
- Fan Z, Robbins M, Staub J. 2006. Population development by phenotypic selection with subsequent marker-assisted selection for line extraction in cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Theor Appl Genet*. 112:843-855.
- Farooq S, Azam F. 2002. Molecular markers in plant breeding: concepts and characterization. *Pak J Biol Sci*. 5:1135-1140.
- Finke E. 2009. Making every drop count in the buildup to a blue revolution. *Science*. 323:1004-1005.
- Flint-Garcia SA, Darrah LL, McMullen MD, Hibbard BE. 2003. Phenotypic versus marker-assisted selection for stalk strength and second-generation European corn borer resistance in maize. *Theor Appl Genet*. 107:1331-1336.
- Gupta PK, Rustgi S. 2004. Molecular markers from the transcribed/expressed region of the genome in higher plants. *Funct Integr Genom*. 4:139-62.
- Gupta PK, Rustgi S, Mir RR. 2008. Array-based high-throughput DNA markers for crop improvement. *Heredity*. 101:5-18.

- Gupta HS, Agrawal PK, Mahajan V, Bisht GS, Kumar A, Verma P, Srivastava A, Saha S, Babu R, Pant MC, Mani VP. 2009. Quality protein maize for nutritional security: rapid development of short duration hybrids through molecular marker assisted breeding. *Curr Sci.* 96:230-236.
- Hayes PM, Corey AE, Mundt C, Toojinda T, Vivar H. 2003. Registration of 'Tango' barley. *Crop Sci.* 43:729-731.
- Heffner EL, Sorrells ME, Jannink JL. 2009. Genomic selection for crop improvement. *Crop Sci.* 49:1-12.
- Helms TC, Nelson BD, Goos RJ. 2008. Registration of 'Sheyenne' Soybean. *J Plant Regist.* 2:20-20.
- Henry RJ. 2008. *Plant genotyping II: SNP technology.* London (UK): CABI.
- Hospital F. 2003. Marker-assisted breeding. In: Newbury HJ, editor. *Plant molecular breeding.* Blackwell Publishing and CRC Press, Oxford and Boca Raton. pp. 30-59.
- Jiang GL, Shi J, Ward RW. 2007. QTL analysis of resistance to Fusarium head blight in the novel wheat germplasm CJ 9306. I. Resistance to fungal spread. *Theor Appl Genet.* 116:3-13.
- Jiang GL. 2013. Molecular markers and marker-assisted breeding in plants. <http://dx.doi.org/10.5772/52583>.
- Johnson R. 2004. Marker assisted selection. In: Jannick J, editor. *Plant Breed Rev.* 24, Part 1:293-309.
- Jonah PM, Bello LL, Lucky O, Midau A, Moruppa SM. 2011. Review: The importance of molecular markers in plant breeding programmes. *Glob J Sci Front Res.* Vol 11. Issue 5.
- Joshi SP, Prabhakar K, Ranjekar PK, Gupta VS. 2011. Molecular markers in plant genome analysis [internet]. Available from <http://www.ias.ac.in/currsci/jul25/articles15.htm>. pp 1-19.

- Kumpatla SP, Buyyarapu R, Abdurakhmonov IY, Mammadov JA. 2012. Genomics-assisted plant breeding in the 21st century: Technological advances and progress. In: Abdurakhmonov IY, editor. *Plant Breeding*, InTech. pp. 131-184.
- Lecomte L, Duffé P, Buret M, Servin B, Hospital F, Causse M. 2004. Marker-assisted introgression of five QTLs controlling fruit quality traits into three tomato lines revealed interactions between QTLs and genetic backgrounds. *Theor Appl Genet.* 109:568-668.
- Lestari P, Pertanian SG, Koh HJ. 2016. Identifikasi dan aplikasi marka berbasis PCR untuk identifikasi varietas padi dengan palatabilitas tinggi. *J AgroBiogen.* 8:69-77.
- Li X, Han Y, Teng W, Zhang S, Yu K, Poysa V, Anderson T, Ding J, Li W. 2010. Pyramided QTL underlying tolerance to *Phytophthora* root rot in mega-environment from soybean cultivar 'Conrad' and 'Hefeng 25'. *Theor Appl Genet.* 121:651-658.
- Liu R, Zhu J. 2014. Non-coding RNAs as potent tools for crop improvement. *Nat Sci Rev.* 1:186-189.
- Luo Y, Sangha JS, Wang S, Li Z, Yang J, Yin Z. 2012. Marker-assisted breeding of Xa4, Xa21 and Xa27 in the restorer lines of hybrid rice for broad-spectrum and enhanced disease resistance to bacterial blight. *Mol Breed.* DOI 10.1007/s11032-012-9742-7.
- Poczai P, Varga I, Laos M, Cseh A, Bell N, Valkonen JPT, Hyvonen J. 2013. Advances in plant gene-targeted and functional markers: A review. *Plant Methods.* 9:6.
- Ribaut JM, de Vicente MC, Delannay X. 2010. Molecular breeding in developing countries: Challenges and perspectives. *Current Opinion in Plant Biology* 13:1-6.

- Richardson KL, Vales MI, Kling JG, Mundt CC, Hayes PM. 2006. Pyramiding and dissecting disease resistance QTL to barley stripe rust. *Theor Appl Genet.* 113:485-495.
- Semagn K, Bjornstad A, Ndjioudjop MN. 2006. Progress and prospects of marker assisted backcrossing as a tool in crop breeding programs. *Afr J Biotechnol.* 5:2588-2603.
- Surahman M, Takdir A, Hipi A. 2012. Evaluasi kemurnian genetik dengan marka mikrosatelit dan aplikasi rizobakteria untuk meningkatkan produksi dan mutu benih jagung hibrida. *J Ilmu Pertan Indones.* 17:22-34.
- Tasliah T, Trijatmiko KR, Prasetyono. 2016. Analisis molekuler dan keragaan agronomis galur-galur padi BC1F1 persilangan code x qTSN4 dan code x. *J AgroBiogen.* 11:17-24.
- Utami DW, Septiningsih EM, Kadir TS, Fatimah FW, Yuriyah SW. 2016. Pencarian alel untuk identifikasi gen ketahanan penyakit hawar daun bakteri, Xa7 pada plasma nutfah padi lokal Indonesia. *J AgroBiogen.* 6:1-9.
- Wammanda DT, Jonah PM. 2006. Biotechnology as a useful tool in wheat (*Triticum aestivum*) improvement. *J Res Agric.* 3:18-23.
- Wang B, Chee PW. 2010. Application of advanced backcross quantitative trait locus (QTL) analysis in crop improvement. *J Plant Breed Crop Sci.* 2:221-232.
- Werner K, Friedt W, Ordon F. 2005. Strategies for pyramiding resistance genes against the barley yellow mosaic virus complex (BaMMV, BaYMV, BaYMV-2). *Mol Breed.* 16:45-55.
- Varsheny RK, Rraner AG, Sorrells ME. 2005. Genomics-assisted breeding for crop improvement. *Trends Plant Sci.* 10: 621-630.

- Vogel B. 2009. Smart breeding-marker-assisted selection: A non-invasive biotechnology alternative to genetic engineering of plant varieties. Greenpeace International Publ. Amsterdam.
- Xu K, Xu X, Fukao T, Canlas P, Maghirang-Rodriguez R, Heuer S, Ismail AM, Bailey-Serres J, Ronald PC, Mackill DJ. 2006. Sub1A is an ethylene-response-factor-like gene that confers submergence tolerance to rice. *Nature*. 442:705-708.
- Xu Y, Crouch JH. 2008. Marker-assisted selection in plant breeding: from publications to practice. *Crop Sci*. 48:391-407.
- Xu Y. 2010. Molecular plant breeding. CAB International. 734 p.

